

Please Click here to view the drawing

Korean FullDoc

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020040096017 A
(43)Date of publication of application: 16.11.2004

(21)Application number: 1020030028811
(22)Date of filing: 07.05.2003

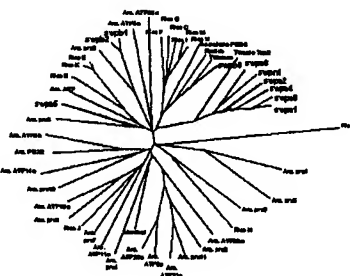
(71)Applicant: KOREA RESEARCH INSTITUTE
OF BIOSCIENCE AND
BIOTECHNOLOGY
(72)Inventor: KWAK, SANG SU
KWON, SEOK YUN
LEE, HAENG SUN
PARK, SU YEONG

(51)Int. Cl. C12N 9 /08

(54) PEROXIDASE PROTEIN ORIGINATED FROM IPOMOEA BATATAS(SWEET POTATO) AND GENE ENCODING THE SAME PROTEIN, THEREBY DEVELOPING MULTIPLE STRESS-RESISTANCE PLANTS

(57) Abstract:

PURPOSE: A peroxidase protein originated from Ipomoea batatas (sweet potato) and a gene encoding the same protein are provided, which gene is expressed in a cultured sweet potato cell and various tissues, and its expression is induced by biological and non-biological stresses, so that it can be useful for development of multiple stress-resistance plants. CONSTITUTION: The peroxidase protein originated from Ipomoea batatas(sweet potato) has the amino acid sequence selected from SEQ ID NO:9 to SEQ ID NO:14, wherein the peroxidase protein is class III peroxidase protein, contains secretion signal peptide in the N-terminal, and preserves Arg-27 and His-42 as an active region. The gene encoding the peroxidase protein originated from Ipomoea batatas(sweet potato) has the nucleotide sequence selected from SEQ ID NO:3 to SEQ ID NO:8.



copyright KIPO 2005

Legal Status

Date of request for an examination (20040218)
Notification date of refusal decision (00000000)
Final disposal of an application (registration)
Date of final disposal of an application (20060623)

(19)대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. <i>C12N 9/08</i> (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년07월06일 10-0596653 2006년06월27일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2003-0028811	(65) 공개번호	10-2004-0096017
(22) 출원일자	2003년05월07일	(43) 공개일자	2004년11월16일

(73) 특허권자 한국생명공학연구원
 대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자 곽상수
 대전광역시유성구전민동464-1엑스포아파트307-306

 권석윤
 대전광역시유성구어은동99한빛아파트119-902

 이행순
 대전광역시유성구어은동한빛아파트126-502

 박수영
 인천광역시서구공촌동경남아파트101동1603호

(74) 대리인 이원희

심사관 : 조영균

(54) 고구마 유래의 펙옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자

요약

본 발명은 고구마 유래의 펙옥시다제 단백질에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 9 내지 서열번호 14로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 고구마 유래 펙옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다. 본 발명의 펙옥시다제 유전자는 고구마 배양세포 및 다양한 조직에서 발현하며, 생물학적, 비생물학적 스트레스에 의해 발현이 유도되기 때문에 이를 이용하여 복합스트레스 내성 식물체를 개발하는데 유용하게 이용할 수 있다.

배경도

도 2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 고구마 유래 펙옥시다제 유전자의 염기서열로부터 추론한 아미노산 서열을 비교한 그림이다.

B: 말단 헴 결합 부위(distal heme binding domain),

D: 중앙 보존 부위(central conserved domain) 및

F: 근위 헴 결합 부위(proximal heme binding domain)

도 2는 본 발명의 고구마 유래 퍼옥시다제 단백질의 아미노산 서열과 44개의 다른 식물 퍼옥시다제 아미노산 서열을 비교하여 유연관계를 나타낸 그림이다.

도 3a는 고구마의 여러 조직에서 본 발명의 고구마 유래 퍼옥시다제 유전자가 발현되는 양상을 확인한 RT-PCR 전기영동 사진이다.

L: 잎, S: 줄기, R: 뿌리, SR: 저장뿌리, Su: 현탁배양세포

도 3b는 고구마 배양세포를 배양한 시간에 따른 본 발명의 고구마 유래 퍼옥시다제 유전자의 발현 양상을 확인한 RT-PCR 전기영동사진이다.

도 4a는 고구마 잎에 상처 스트레스를 준 후 12, 40 및 72시간째의 본 발명의 고구마 유래 퍼옥시다제 유전자 발현 양상을 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 4b는 고구마 잎에 메틸 비올로젠을 처리한 후 12, 24 및 48시간째의 본 발명의 고구마 유래 퍼옥시다제 유전자 발현 양상을 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 4c는 고구마 잎을 4℃로 저온 처리 및 37℃로 고온 처리한 후의 퍼옥시다제 유전자 발현 변화를 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 4d는 고구마 잎을 과산화수소 및 염화나트륨으로 처리한 후의 퍼옥시다제 유전자 발현 변화를 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 4e는 고구마 잎을 압세스산 및 자스몬산으로 처리한 후의 퍼옥시다제 유전자 발현 변화를 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 5a는 여러 종류의 고구마 잎 절편에 무름병균을 감염시킨 후 시간에 따른 퍼옥시다제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 5b는 여러 종류의 고구마 잎 절편에 무름병균을 감염시켰을 때의 퍼옥시다제 유전자 발현을 노던블롯 사진이다.

도 6은 본 발명의 고구마 유래 퍼옥시다제 유전자가 고구마의 게놈상에 존재하는 것을 확인한 서던블롯 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 고구마 유래의 퍼옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것으로, 구체적으로는 고구마 유래의 산성 및 염기성의 퍼옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

퍼옥시다제(oxidase)는 과산화수소를 이용해 각종 기질(基質)을 산화시키는 반응을 촉매하는 효소로서 미생물을 비롯하여 동식물까지 광범위하게 존재한다. 퍼옥시다제는 반응 특이성 및 구조에 따라 클래스 I, 클래스 II 및 클래스 III로 분류된다(Hiraga *et al.*, *Plant Cell Physiol*, 42, 462-468, 2001). 효모의 미토콘드리아 사이토크롬 c 퍼옥시다제(mitochondria cytochrome c oxidase), 엽록체(chlorophyll) 또는 세포질의 아스코베이트 퍼옥시다제(ascorbate

peroxidase) 등은 클래스 I에 속하며, 곰팡이의 분비형 퍼옥시다제(secretive peroxidase)는 클래스 II에 속한다. 클래스 III 퍼옥시다제는 세포외로 분비되거나 액포로 이동되며 대표적으로 서양고추냉이의 퍼옥시다제를 포함하는 식물의 퍼옥시다제가 포함된다. 클래스 III 식물 퍼옥시다제는 식물에서 보편적으로 발견되며, 많은 수의 아이소자임을 가지고 있다.

식물의 클래스 III 퍼옥시다제는 다양한 생리반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉, 목질화(lignification), 코르크질화(suberization), 세포벽 단백질의 결합, 오옥신 분해, 병원균 침입에 대한 방어, 염류장애에 대한 방어 및 노쇠과정 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Fry, *Annu Rev Plant Physiol*, 37, 165-186, 1986; Lagrimini *et al.*, *Hort Sci*, 28, 218-221, 1993; Mohan *et al.*, *Plant Mol Biol*, 21, 341-354, 1993; Zimmerlin *et al.*, *Biochem J*, 299, 747-753, 1994). 또한, 식물의 클래스 III 퍼옥시다제는 식물의 발생, 성장 및 분화에 있어서 다양한 생리적 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 생물학적 스트레스(biotic stress) 및 비생물학적 스트레스(abiotic stress)에 의해 그 효소활성이 증대되는 것이 보고되어 이들 스트레스에 대한 식물체의 적응에 있어서도 중요한 역할을 할 것이라고 여겨진다. 그러나, 이들 효소에 대한 개개 아이소자임(isozyme)을 이용한 연구는 아직 부족한 실정이다.

퍼옥시다제는 활성산소종(슈퍼옥사이드 음이온 라디칼, 과산화수소, 하이드록실 라디칼, 일중항 산소)의 하나인 과산화수소를 제거하는 역할을 한다. 생체내에서 활성산소종의 농도는 매우 엄격하게 조절되고 있으나, 식물체가 다양한 환경스트레스(고온, 저온, 오존, 화학물질 등에 의한 비생물학적 스트레스 및 병원균, 바이러스, 곤충 등에 의한 생물학적 스트레스)에 직면하게 되면 활성산소종의 농도가 증가되어 산화 스트레스를 받게 된다. 이러한 산화 스트레스에 대한 방어기작으로 식물체는 비타민 C(ascorbic acid) 및 비타민 E(tocopherol) 등의 저분자 항산화물질과 슈퍼옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(catalase, CAT), 퍼옥시다제 등의 항산화효소로 구성된 항산화기구를 구비하고 있다.

지구 환경의 악화로 인해 식물체는 많은 환경스트레스를 받고 있는데, 퍼옥시다제 등의 항산화효소는 환경스트레스에 의해 과도하게 발생하는 활성산소종의 효율적인 제거에 이용될 수 있으며, 다양한 항산화효소 유전자가 도입된 형질전환 식물체는 산화스트레스 조건에서도 스트레스 내성을 갖고 있음이 밝혀졌다.

게놈정보가 완전히 밝혀진 아기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 73개의 클래스 III 퍼옥시다제 유전자를 가지고 있는 것이 밝혀졌으며(Welinder *et al.*, *Eur J Biochem*, 269, 6063-6081, 2002; Tognolli *et al.*, *Gene*, 288, 129-138, 2002), 벼에서는 적어도 21개의 퍼옥시다제 유전자가 발현되고 있다(Hiraga *et al.*, *FEBS Lett*, 471, 245-250, 2000).

본 발명자들은 고구마(*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv White Star) 배양세포에는 적어도 30개 이상의 퍼옥시다제가 존재한다는 것을 활성염색으로 확인하였으며, 고구마 식물체로부터 유도한 배양세포를 이용한 퍼옥시다제 생산에 관하여 보고한 바 있다(대한민국 특허등록 제117516호; *한국생화학회지*, 27, 132-137, 1994; *Phytochemistry*, 39, 981-984, 1995). 또한, 본 발명자들은 산성의 퍼옥시다제 유전자 3종과 중성의 퍼옥시다제 유전자 1종을 분리하여 이들 유전자들이 배양세포에서 특이적으로 발현되며 다양한 산화적 스트레스에 의해 발현이 유도되는 특성을 갖고 있음을 확인하였으며(Huh *et al.*, *Mol Gen Genet*, 255, 382-391, 1997; Kim *et al.*, *Mol Gen Genet*, 261, 941-947, 1999), 또한 이들 유전자를 이용한 퍼옥시다제의 대량생산에 관하여 보고한 바 있다(대한민국 특허등록 제176420호). 특히, swpa2 유전자의 게놈 DNA로부터 얻은 프로모터(SWPA2 promoter)는 과산화수소, 상처, 자외선 등에 의해 발현이 강하게 유도되며 배양세포에서 특이적으로 고발현하는 특성이 있어 산업적으로 이용가능성이 클 것으로 기대된다(대한민국 특허출원 제2000-61231호; PCT 출원 KR 00/01231호).

이에, 본 발명자들은 고구마 배양세포로부터 퍼옥시다제를 암호하는 신규 유전자를 대량으로 분리하여 이의 염기서열 및 아미노산 서열을 결정하였으며, 분리된 퍼옥시다제 유전자들이 고구마 배양세포에서 특이적으로 발현되는 것을 확인하였을 뿐만 아니라 다양한 화학적 스트레스, 물리적 스트레스 및 박테리아 감염에 의한 생물학적 스트레스에 의해 이들 유전자의 발현 양상이 다름을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 고구마 유래 퍼옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 산성 또는 염기성의 고구마 유래 퍼옥시다제 단백질을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 퍼옥시다제 단백질을 코딩하는 고구마 유래 퍼옥시다제 유전자를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 산성 또는 염기성의 고구마 유래 퍼옥시다제 단백질을 제공한다.

본 발명의 퍼옥시다제 단백질은 서열번호 9 내지 서열번호 14로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 퍼옥시다제 단백질은 모두 클래스 III 퍼옥시다제 단백질로 분류되며, 아미노산 서열 사이에는 서로 30 내지 80%의 상동성을 갖고 있고, N-말단에는 세포외로 분비되는데 관여한다고 알려진 분비신호 펩타이드를 포함하고 있으며, 퍼옥시다제 활성부위로 알려진 Arg-27 및 His-42가 보존되어 있다(도 1 및 표 2 참조).

또한, 본 발명의 퍼옥시다제 단백질의 아미노산 서열은 다른 식물에서 분리되어 보고된 44개의 퍼옥시다제 아미노산 서열과 비교하였을 때 특별한 유연관계가 확인되지 않는다(도 2 참조). 또한, 서열번호 9 내지 서열번호 11로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 단백질은 등전점(pI)이 각각 4.58, 5.68 및 5.07로 나타나 산성 단백질임을 알 수 있으며, 서열번호 12 내지 서열번호 14로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 단백질은 등전점이 각각 8.84, 9.93 및 9.57로 나타나 염기성 단백질임을 알 수 있다(표 1 참조).

또한, 본 발명은 상기 퍼옥시다제 단백질을 코딩하는 고구마 유래 퍼옥시다제 유전자를 제공한다.

본 발명의 유전자는 서열번호 9 내지 서열번호 14로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하며, 서열번호 3 내지 서열번호 8로 구성된 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 것이 바람직하다.

본 발명자들은 상기 서열번호 3 내지 서열번호 8로 기재되는 염기서열을 가지는 유전자를 각각 "swpa4", "swpa5", "swpa6", "swpb1", "swpb2" 및 "swpb3"라 명명하였다.

본 발명의 고구마 유래 퍼옥시다제를 코딩하는 유전자는 고구마의 계놈상에 존재하고(도 3 참조), 잎, 줄기, 뿌리, 저장뿌리와 같은 다양한 조직 및 현탁배양세포에서 다양하게 발현되며(도 4a 참조), 배양세포의 배양시간이 증가함에 따라 유전자의 발현량이 거의 일정하거나 점차 증가하는 경향을 보인다(도 4b 참조).

또한, 본 발명의 고구마 유래 퍼옥시다제를 코딩하는 유전자는 상처(도 5a 참조), 활성산소(도 5b 참조), 고온 및 저온의 온도변화(도 5c 참조), 화학물질(도 5d 및 도 5e 참조)과 같은 비생물학적 스트레스에 의해 대부분 발현이 증가한다. 그리고, 무름병원인균과 같은 생물학적 스트레스에 의해 퍼옥시다제의 활성이 증가하고(도 6a 참조), 퍼옥시다제를 코딩하는 유전자의 발현도 또한 증가한다(도 6b 참조).

상기에서 살펴본 바와 같이, 고구마 배양세포로부터 분리된 서열번호 3 내지 서열번호 8로 기재되는 염기서열을 가지는 퍼옥시다제 유전자는 고구마 배양세포에서 특이적으로 강하게 발현하고, 다양한 스트레스 처리에 의해 발현이 유도되기 때문에 이 유전자 자체를 이용하거나, 유전자의 일부를 변형시킴으로써 환경 스트레스에 대한 적응성을 증대시키는 재료로 이용할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 퍼옥시다제 유전자의 클로닝, 염기서열 분석, 유연관계 분석

배양한지 20일 된 고구마 현탁배양 세포(대한민국 특허 등록 제176420호)로부터 mRNA를 분리하고, 역전사효소를 이용하여 mRNA로부터 cDNA를 합성한 후 이를 람다(lambda) ZAP II 벡터(Stratagene)에 삽입하여 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재되는 프라이머로 PCR을 수행하여 퍼옥시다제(peroxidase) 유전자를 스크리닝하기 위한 탐침 DNA를 제작하였다. 상기 제작된 탐침 DNA를 이용하여 통상의 방법으로 라이브러리를 스크리닝하여, 벡터에 삽입된 cDNA 절편의 크기가 1 kb 이상인 클론 218개를 확보하였다. 상기 클론으로부터 DNA를 분리하여 ABI 3700 염기서열결정기(PE Biosystems)로 삽입된 유전자의 5'-말단 염기서열을 결정하고 블라스트(Blast) 분석(<http://www.pdrc.re.kr>)을 수행하였다.

그 결과, 클론에 삽입된 DNA는 클래스 III 퍼옥시다제 유전자임을 확인하였다. 이 중 20개의 클론에 대하여 전체 염기서열을 결정하고, 염기서열로부터 아미노산 서열을 추론하였으며, 추론된 아미노산 서열을 기초로 성숙 단백질(mature protein)의 등전점(isoelectric point)에 따라 산성, 중성 및 염기성의 세 가지 그룹으로 구분하였다(ExPasy 프로그램(<http://www.expasy.org/tools/>), PSORT 프로그램(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>)). 세 개의 그룹을 세분하여 산성의 퍼옥시다제 6 종류, 중성의 퍼옥시다제 6종류 및 염기성의 퍼옥시다제 8종류로 구분하였다. 상기 그룹으로부터 6개의 퍼옥시다제 유전자, 즉 산성 퍼옥시다제 유전자로 **서열번호 3**으로 기재되는 swpa4 유전자, **서열번호 4**로 기재되는 swpa5 유전자, **서열번호 5**로 기재되는 swpa6 유전자 및 염기성 퍼옥시다제 유전자로 **서열번호 6**으로 기재되는 swpb1 유전자, **서열번호 7**로 기재되는 swpb2 유전자, **서열번호 8**로 기재되는 swpb3 유전자를 확보하였다. 상기 **서열번호 3** 내지 **서열번호 8**로 기재되는 고구마 퍼옥시다제 유전자는 서로 다른 3'-말단 염기서열을 포함하는 등 서로 다른 특성을 가지고 있었다. 또한, 상기 **서열번호 3** 내지 **서열번호 8**로 기재되는 유전자 각각으로부터 코딩된 단백질은 **서열번호 9** 내지 **서열번호 14**로 기재되는 아미노산 서열을 가지고 있었다. 분리된 6 종류의 퍼옥시다제는 모두 클래스 III 퍼옥시다제로 분류되었으며, 아미노산 서열의 N-말단에는 세포외 분비에 관여한다고 알려진 분비신호를 포함하고 있었다(표 1 및 도 1). 도 1에서는 N-말단의 분비신호를 소문자 이탤릭체로 나타내었다.

[표 1]

퍼옥시다제 유전자	swpa4	swpa5	swpa6	swpb1	swpb2	swpb3
cDNA의 길이(bp)	1,283	1,390	1,284	1,257	1,263	1,290
5-UTR의 길이(bp)	36	40	37	59	60	47
3-UTR의 길이(bp)	157	330	165	164	166	260
추정되는 poly A 첨가신호 (poly A로부터의 거리, bp)	AATAAA (-68)	AAT(G)AAA (-21)	AATAAA (-24)	AATAA(T) (-119)	AATAAA (-122)	AATAAA (-17)
성숙단백질의 아미노산 수	335	304	334	310	314	297
단백질의 분자량	36.29	32.21	35.18	33.96	34.35	31.98
단백질의 등전점(pI)	4.58	5.68	5.07	8.84	9.33	9.57
분비신호의 길이 (아미노산 갯수)	21	23	20	23	23	24
분비여부	ER 막	분비	분비	분비	분비	분비

또한, 상기 **서열번호 9** 내지 **서열번호 14**로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 6개 퍼옥시다제 단백질간의 아미노산 서열 상동성을 조사한 결과, 30-80%의 상동성을 갖고 있었으며(표 2), 퍼옥시다제 활성부위로 알려진 Arg-27 및 His-42가 보존되어 있었다(도 1).

[표 2]

	swpa4 (356*)	swpa5 (327*)	swpa6 (354*)	swpb1 (333*)	swpb2 (337*)	swpb3 (321*)
swpa4						
swpa5	38					
swpa6	60	40				
swpb1	36	48	40			
swpb2	36	47	39	86		
swpb3	43	49	46	51	48	

상기에서 *는 염기서열로부터 추론된 아미노산 개수를 의미한다.

또한, 고구마로부터 분리한 10종의 퍼옥시다제 단백질(swpa1, swpa2, swpa3, swpa4, swpa5, swpa6, swpb1, swpb2, swpb3) 및 애기장대와 벼 등에서 분리한 40 여종의 퍼옥시다제 단백질 사이의 유연관계를 ClustalW 프로그램 (<http://plant.pdrc.re.kr/gene/align/clustalW.html>)를 이용하여 조사하였으나, 본 발명에서 분리한 퍼옥시다제 단백질과의 특별한 유연관계는 확인되지 않았다(도 2).

<실시예 2> 고구마 조직 및 세포의 배양시기에 따른 퍼옥시다제 유전자의 발현 변화 분석

고구마 현탁배양 세포로부터 분리한 본 발명의 고구마 퍼옥시다제 유전자가 고구마의 조직 및 세포 배양 시기에 따라 발현하는 양상을 분석하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 통상의 방법으로 고구마 조직(잎, 줄기, 뿌리, 저장 뿌리), 현탁 배양 세포 및 배양한 시간별 현탁배양세포(0.5, 5, 11, 14, 20, 30시간)로부터 총 RNA를 추출한 후 퍼옥시다제 유전자 특이적 프라이머를 사용하고 RT-PCR 키트(Gibco BRL)를 이용하여 퍼옥시다제 유전자의 발현 양상을 조사하였다. swpa4에 특이적인 프라이머로는 서열번호 15 및 서열번호 16으로 기재되는 프라이머, swpa5에 특이적인 프라이머로는 서열번호 17 및 서열번호 18로 기재되는 프라이머, swpa6에 특이적인 프라이머로는 서열번호 19 및 서열번호 20으로 기재되는 프라이머, swpb1에 특이적인 프라이머로는 서열번호 21 및 서열번호 22로 기재되는 프라이머, swpb2에 특이적인 프라이머로는 서열번호 23 및 서열번호 24로 기재되는 프라이머, swpb3에 특이적인 프라이머로는 서열번호 25 및 서열번호 26으로 기재되는 프라이머를 사용하였다.

그 결과, 분리한 6종의 퍼옥시다제 유전자는 모두 현탁배양 세포에서 강하게 발현되었다. swpa4의 경우 고구마 식물체의 조직에서는 발현되지 않았으며, swpa6는 뿌리 및 줄기에서 강하게 발현하였고, swpb1는 고구마 뿌리 및 저장뿌리에서 강하게 발현하였으며, swpb3는 줄기에서 강하게 발현하였다(도 3a). 따라서, 고구마 현탁배양세포에서 분리한 본 발명의 퍼옥시다제 유전자는 식물체의 조직에 따라 다양하게 발현함을 알 수 있었으며, 이는 각 조직에서 서로 다른 기능을 수행할 것임을 알 수 있었다.

또한, swpa4, swpa5, swpb2, swpb3는 현탁배양하는 시간에 따라 발현이 증가되는 경향을 나타낸 반면, swpa6 및 swpb1은 배양 시간에 관계없이 항상 강한 발현을 나타내었다(도 3b). 따라서, 본 발명의 퍼옥시다제 유전자는 세포배양시기에 따라 서로 다르게 발현이 조절되고 있음을 알 수 있었다.

<실시예 3> 비생물학적 스트레스에 따른 퍼옥시다제 유전자의 발현 변화

본 발명의 퍼옥시다제 유전자가 비생물학적 스트레스에 대해 반응하는 정도를 분석하기 위해, 상처, 활성 산소종 생성 유도, 온도 및 화학물질과 같은 다양한 비생물학적 스트레스를 준 후 퍼옥시다제 유전자의 발현변화를 RT-PCR로 분석하였다.

먼저, 상처 스트레스를 주기 위해 온실에서 생육중인 고구마의 잎에 침봉으로 상처를 주고 12시간, 40시간, 72시간 후 통상의 방법으로 RNA를 분리한 후 상기 실시예 2에서 수행한 바와 같이 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 상처처리 12시간 후부터 본 발명의 퍼옥시다제 유전자 6개 모두의 발현이 유도되기 시작하였으며, swpa6를 제외한 나머지 5개 유전자는 상처처리 72시간 후 최대의 발현을 나타내었다(도 4a).

다음으로, 활성 산소종(reactive oxygen species)을 생성하는 제초제인 메틸 비올로젠(methyl viologen, MV) 용액 50 μ M을 고구마 식물체에 분무한 뒤 6시간, 12시간, 24시간 및 48시간 경과 후 잎으로부터 RNA를 분리하여 상기 실시예 2에 기재한 바와 동일하게 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 퍼옥시다제 유전자는 모두 메틸 비올로젠에 반응하여 발현이 증가되었는데, 발현 유도 시간 및 강도가 서로 상이하게 나타났다. swpa5는 메틸 비올로젠 처리후 6시간만에 발현이 유도되어 가장 빨리 발현이 유도된 후 점차 발현이 감소되었으나, swpb3는 시간 경과에 따라 발현이 점차 증대되어 72시간 후 발현이 최대로 나타났다(도 4b).

그 다음으로, 온도 스트레스를 주기 위해 기내 배양중인 고구마 식물체를 48시간동안 4℃로 저온 처리 및 12시간 동안 37℃로 고온 처리한 뒤 통상의 방법으로 RNA를 분리하여 상기에서 실시한 바와 동일하게 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, swpa4는 저온 및 고온 처리에 의해 발현이 강하게 증가한 반면, swpa6는 온도 스트레스에 의한 발현 변화가 관찰되지 않았다. swpa5, swpb1, swpb2 및 swpb3은 고온 스트레스에 의해서만 발현이 증가하였다(도 4c). 따라서, 이러한 온도 스트레스에 대한 퍼옥시다제 유전자의 반응을 통해 본 발명의 퍼옥시다제 유전자는 고구마 식물체가 온도 스트레스에 대해 적응하는데 관여하고 있음을 알 수 있었다.

또한, 화학물질에 대한 퍼옥시다제 유전자의 발현변화를 조사하기 위해 상부로부터 세 번째의 잎(고구마의 엽병)을 과산화수소 440 mM, 염화나트륨 100 mM, 앵시스산 100 μ M 및 메틸자스몬산 100 μ M 농도로 각각 포함하는 용액 30 ml에 48 시간동안 침지시켜 화학물질이 흡수되도록 처리하였다. 이때 과산화수소 및 염화나트륨에 대한 대조군으로는 멸균수를 사용하였으며, 앵시스산과 메틸자스몬산에 대한 대조군으로는 0.1% DMSO 용액을 사용하였다. 상기 처리후 통상의 방법으로 RNA를 분리한 후 상기에 기재된 방법과 같이 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 과산화수소를 처리한 경우는 swpa4, swpb1, swpb2 및 swpb3의 발현이 강하게 유도되었으며, 염화나트륨을 처리한 경우는 swpa4의 발현이 강하게 유도되었다(도 4d). 앵시스산을 처리한 경우는 swpa4, swpb1, swpb2 및 swpb3의 발현이 유도되었으며, 메틸자스몬산을 처리한 경우는 swpa4, swpa5, swpb2 및 swpb3의 발현이 증가되었다(도 4e).

<실시에 4> 생물학적 스트레스에 따른 퍼옥시다제 유전자의 발현 변화

본 발명의 퍼옥시다제 유전자가 생물학적 스트레스에 대해 반응하는 정도를 분석하기 위해, 무름병원균을 감염시킨 후 퍼옥시다제 유전자의 발현변화를 RT-PCR로 분석하였다. 무름병의 원인균인 껍토박테리움 크리산테미(*Pectobacterium chrysanthemi*, KCTC 2569)를 10^4 세포수/ml이 되도록 희석한 후 온실에서 재배 중인 4 품종의 고구마(신황미, 화이트 스타, 울미, 자미)의 직경 18 mm의 잎 절편에 접종하였다. 상기 접종 후 12, 16, 20, 24 및 36시간째에 잎 절편을 회수하여 총 퍼옥시다제 활성 및 노던블롯 분석을 수행하였다. 퍼옥시다제의 활성은 피로갈톨을 기질로 사용하여 시그마(Sigma)사의 방법에 따라 측정하였다(대한민국 특허등록 제117516호; *한국생화학회지*, 27, 132-137, 1994; *Phytochemistry*, 39, 981-984, 1995). 또한, 노던블롯 분석은 상기 RT-PCR을 수행함으로써 증폭된 PCR 밴드로부터 추출한 DNA를 탐침자로 사용하여 통상의 방법으로 수행하였다.

총 퍼옥시다제 활성을 측정한 결과, 신황미 및 화이트 스타 잎절편의 퍼옥시다제 활성은 감염 후 24시간에 최고에 이르렀다가 감소하는 경향을 보인 반면, 자미 및 울미 잎절편의 퍼옥시다제 활성은 36시간까지 점차 증가하였다(도 5a). 또한, 퍼옥시다제 유전자의 발현량을 분석한 노던블롯 분석에서도 상기와 동일한 결과를 나타내었는데, 6개 퍼옥시다제 유전자의 발현은 병원균 접종에 의해 증가되었고, 특히 swpa4는 다른 퍼옥시다제보다 매우 강하게 발현이 유도되었다(도 5b). 따라서, 일부 퍼옥시다제가 병발생과정에 관여한다는 것을 알 수 있으며, 특히 swpa4의 프로모터는 병발생 과정에서 관련 유전자의 발현에 대한 연구와 병저항성 식물체의 개발에 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

<실시에 5> 퍼옥시다제 유전자의 써던 블롯 분석

본 발명의 퍼옥시다제 유전자가 고구마 게놈(genome)내에 존재하는 유전자임을 확인하기 위하여 써던 블롯 분석(Southern blot analysis)을 실시하였다. 통상의 방법으로 고구마 배양세포로부터 게놈 DNA를 분리, 정제한 후 *EcoRI*, *HincII* 및 *HindIII*로 절단하였다. 제한효소로 절단된 게놈 DNA를 전기영동한 후 각 퍼옥시다제 유전자의 서로 다른 3'-말단 염기서열인 상기 실시예 4의 노던블롯 분석에서 사용한 탐침자를 이용하여 써던 블롯 분석을 수행하였다.

그 결과, 각 퍼옥시다제 유전자는 서로 다른 제한효소로 절단하였을 때 절단되는 패턴이 달랐으며, 탐침자가 인식하는 밴드가 2개 이상 존재하여 본 발명의 퍼옥시다제 유전자는 게놈내에 복수로 존재하고 있음을 알 수 있었다(도 6).

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 고구마 유래 퍼옥시다제 단백질을 코딩하는 유전자는 고구마 배양세포 및 다양한 조직에서 발현하며, 생물학적, 비생물학적 스트레스에 의해 발현이 유도되기 때문에 이를 이용하면 복합스트레스에 대해 내성을 가지는 식물체를 개발하는데 유용하게 이용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열로 이루어진 고구마 유래 퍼옥시다제 단백질.

청구항 2.

제 1항의 퍼옥시다제 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 서열번호 3으로 기재되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

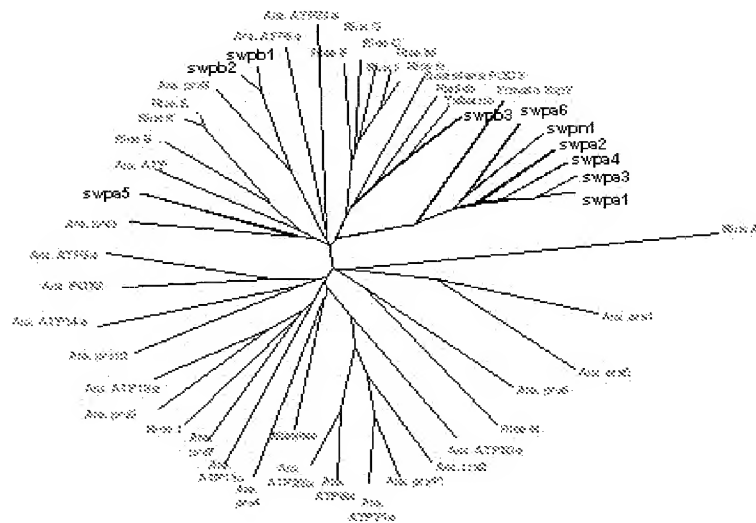
삭제

도면

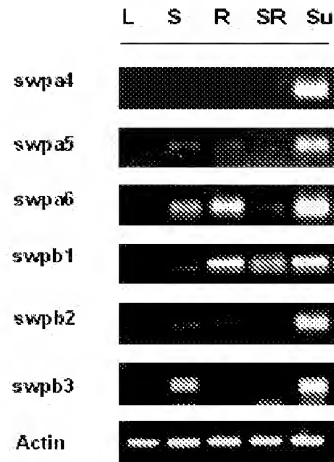
도면1

swpa4	masfvtrlsalafialagfsiyqnthameg-qlkltpewlluntlessvadvi-slelg	61
swpa5	-----masfssllamalaisi-----flshanaqlsstfy-sttcfp-----	36
swpa6	masfatklslalslalydagsiyqntyasaingtelqliptwl-detles--anilralglg	60
swpb1	marvircffmailllafapvelcgeg---ygg---slypqyy-ekscpr-----	42
swpb2	marvircffmailllafapvelcgeg---yggggsslypqyy-ekscpr-----	46
swpb3	-----mavvvkaltavfvcvly---lvggcsaqlspgy-sksckp-----	37
B		
swpa4	-ISSGLSDEDCIFSAYKEVYDAIDAETRMGASLIRLFHDFVYDGCDAGLLNDIPT-FTB	122
swpa5	-----YSSIVSTVIQQALQMDARIGASLIRLFHDFVYDGCDSILLDNGTTIVS	87
swpa6	ESSSGLSDEACVFSAYKEIVEAAITNETRMGASLIRLFHDFVYDGCDSILLNAT-----NG	119
swpb1	-----ALRIVRSEVAKAVAKEARMAASLIRLFHDFVYDGCDSILLDS-GNGITS	92
swpb2	-----ALRIVRSEVAKAVAKEARMAASLIRLFHDFVYDGCDSILLDS-GNGITS	96
swpb3	-----LFQTVNSVVSIAQKEARMGASLIRLFHDFVYDGCDSILLDD-TSSFTG	87
D		
swpa4	EQTAGGNNSVTGFVVIQAKENVITKPYIQVSCADILSIAARDSFQBFGTGETYTVILGRLO	185
swpa5	EKDAAPNNNSARGFDVVDNIETAVENACPGV-VSCADILASESASVSLASGSPSWNLGRRD	149
swpa6	EQSAPANNNSYRGFEVIERAQNAESECSDTPVSCADVLIAARDSVYKLGQTYTVNLGRRD	182
swpb1	EKNSNPNNSARGFDVVDIIAALKEKPCQT-VSCADIMQLAARDSTHLGGPFWEVPVGRKD	154
swpb2	EKNSNPNNSARGFNVDDIIAALKEKPCPT-VSCADIMQLAARDSTHLGGPFWEVPVGRKD	158
swpb3	EKRAAPNFGSARGFEVDQIESAYKEVC PGV-VSCADILAIASDSTVILGGPSWNLGRRD	149
F		
swpa4	ARTANLTGANTQLVGPNEELASQVEKFAAKGFSSETELVALLGSHVYGFSECPPLLCV-----	241
swpa5	SRTANQAGANTSIPAPFESLSNITTFESMVGLNVNDLVALSGSHTFGBACBTFSNBLNFSN	212
swpa6	ARSEMLTGANNQLPAPFDLATQTRFADIGFNGNTMVALAGSHVYGFACAVLCS-----	238
swpb1	SESASLSGSSNNIPAPNSTFQTLNBFENQGLDVLVALSGSHTIGNSHCYSPFRQLYNGAG	217
swpb2	SESASLSGSSNNIPAPNSTFQTLNBFENQGLDVLVALSGSHTIGNSICTSPFRQLYNGSG	221
swpb3	ARTASQAANNISIPAPTSNINRLISSFAYGLSTNDMVVLSSSHTIGGACNTNFRARIYN----	209
G		
swpa4	---PIFINPARASTLQCMCVSPD---DTGLVGLDPT-PLTWDQSPYSJYANGQGLLFSINEL	287
swpa5	TGNPDSHLEHNLSTLQCMCVGGG---GSTVNLDPITPTDFTDSSTFSMLQNRGLQSDQEL	273
swpa6	---SNLNQARNSTLQCMCVYAG---DAGLVGLDPT-PTMDTTRYFRDIYDGGQLLPSDQVL	294
swpb1	NNQPDSTLDQYAAQLRNC PRSGG---DSNLFFLDVSPTEFINDSYFELLANKGLNSDQVL	278
swpb2	NSKPDSTLDQYAAQLRNC PRSGG---DQNLFFLDVSPTEFINDSYFELLANKGLNSDQVL	282
swpb3	---ESNIDSSFAQSRHNC PRASGSGDNLAPLDLQTPIKFINDVYVNLVXKGLHSDQQL	268
H		
swpa4	MNSN---TTSAAVRYRDEMADFADFAAAMVEMSLPPSPGVELEIREVCSEVNANTVASM	356
swpa5	FSTSGAATIAIVNSFSANQTAFQSFVQSMINMGNISPLTGSGEIRLNCRRFN-----	327
swpa6	LNGT---TTTAAVRYRDTGTAFLSDFAAMVEMGNLAPSAGVQLEIRDMCSIVNPTSVAAM	353
swpb1	TTKN-EASLQLVIAAENNELFLQHFASSMIEMANISPLTGSNGEIRENCRKINS-----	332
swpb2	TTKS-EASLQLVIAAENNELFLQHFASSMIEMANISPLTGSNGEIRENCRKINS-----	336
swpb3	PNG---YSTDSTVRGYSTNPSYFKSDFAAAMIEMGDIKPLTGNGEIRENCRERN-----	320

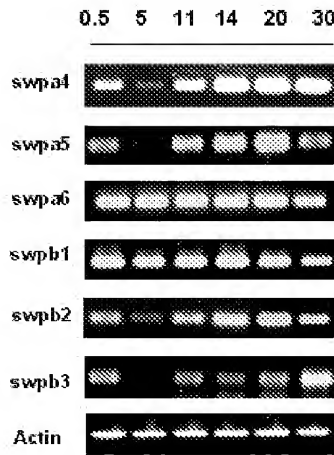
도면2



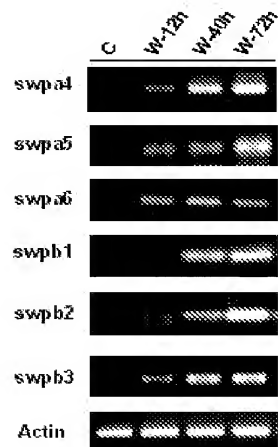
도면3a



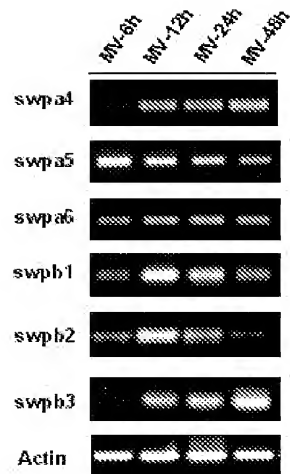
도면3b



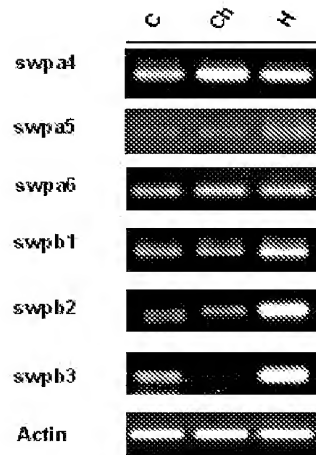
도면4a



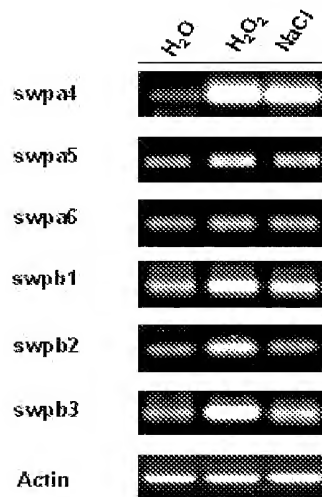
도면4b



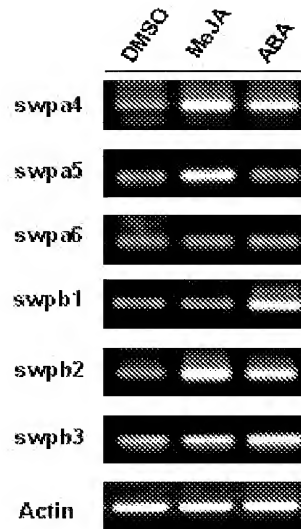
도면4c



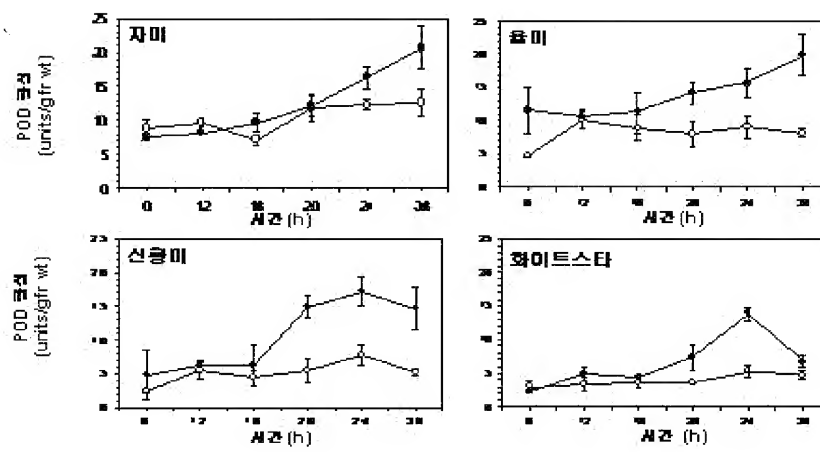
도면4d



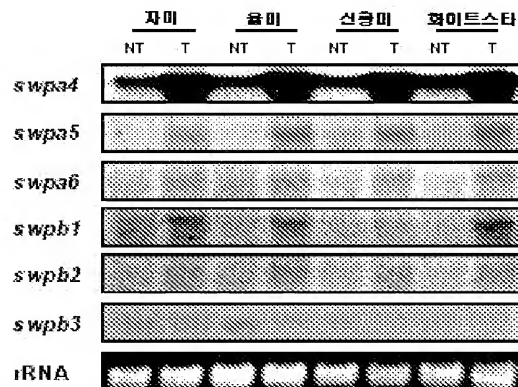
도면4e



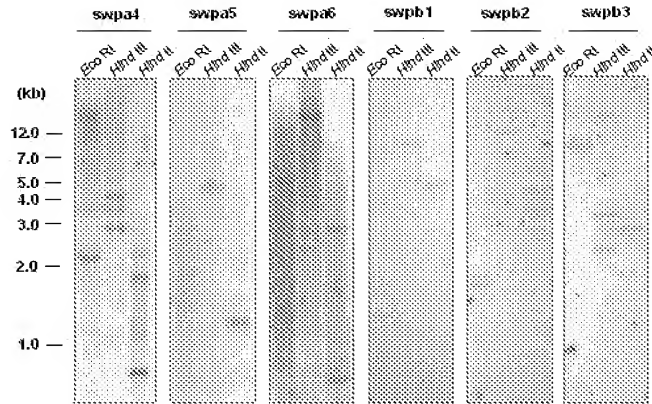
도면5a



도면5b



도면6



서열목록

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
 <120> Peroxidase protein originated from Ipomoea batatas and gene coding the same
 <130> 3p-04-26
 <160> 26
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer for peroxidase gene of Ipomoea batatas
 <400> 1
 cacttccacg actgcttcgt 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer for peroxidase gene of Ipomoea batatas
 <400> 2
 acgaagcagt cgtggaagtg 20
 <210> 3
 <211> 1283
 <212> DNA
 <213> Ipomoea batatas
 <400> 3
 cttcttcata cttcctttgc tgtgataatc atcatcatgg cttcctttgt cactcggctc 60
 agcctggccc ttagcttcat cgccctagcc ctagctggct tctccattta ccagaataacc 120
 catacagcca tgaaagggca gcttaagctc accccaaagt ggctgctaga caacactcta 180
 gagtcgtcag tggccgacgt gctctcacta cgcctaggca tctcctccgg aaagctttcc 240
 gacgaagact gcatattctc cgccgttaag gaagtgggtg acgccgccat tgatgcagaa 300
 acccgcatgg gtgcttcctt cattcgctc ttcttccatg actgggtttgt tgatgggtgt 360
 gacgcaggtc ttctactaaa cgatacacct actttcacgc gagaacagac cgccggcggc 420

aataataact	cagtcacagg	ttttgaggtg	atacaacaag	ctaaagagaa	tgtgataacc	480
aatgtccct	acatacaagt	atcttgtgcc	gacatcttat	ccattgctgc	ccgtgattct	540
ttccagagat	ttactggaga	aacgtacacc	gtgactctgg	gaagactcga	tgcaagaacg	600
gcgaacctta	ccggagctaa	cacccaactc	gtcggaccaa	acgaggaatt	ggcatcgcaa	660
gtcgagaaat	ttgcggcgaa	agggttctcc	gaaacggagc	tagtcgcctt	gttaggtgtt	720
cacacggttg	ggttttcgag	atgtccgctt	ttatgcgttc	ccattttcat	caatcccgcc	780
cgggcctcca	cgctgcaatg	caactgtccg	gtgagtcccg	acgacaccgg	gctggtgggc	840
ctggaccca	ctccgttgac	gtgggaccaa	agtttttact	ccgacgtggc	taacgggtcaa	900
gggcttctgt	tctccgacaa	cgagctgatg	aatagcaaca	ccaccagcgc	cgccgttagg	960
aggtacaggg	acgagatgga	cgcttttctc	gccgatttctg	ccgccgccat	ggtgaagatg	1020
agcctcctgc	cgccgtcccc	cggagtggag	ctcgaaatcc	gagagggttg	cagcgagggtg	1080
aatgccaaca	cagttgcctc	catgtgaagt	tcgttcccat	cgacatcaat	aacgtctgtg	1140
attctgtgaa	agttttactc	ggactgtgaa	gaattttcac	tttctgttgt	ttctgaaata	1200
aaaaagattt	tttttttatg	tcctaacaaa	acttgtatta	ctgaataaaa	tttataaatt	1260
tgttaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa				1283

<210> 4

<211> 1390

<212> DNA

<213> Ipomoea batatas

<400> 4

attaattacc	caataataaa	tcacaaaaag	cccaacaaaa	atggtcttct	ttttcttccct	60
tttagccatg	gcactcgcca	tttccatctt	cttatctcac	tcaaagtctc	agctaagttc	120
cactttttac	tccaccacgt	gccctaacgt	gtcctcaatc	gttagcactg	tgattcaaca	180
ggccttgag	aacgatgccc	gcattgggtg	cagcctcatt	cgcctccatt	ttcacgactg	240
cttcgttaat	gggtgtgatg	gttcaatttt	gctagataac	aatggaacaa	caattgtcag	300
tgagaaagat	gctgccccaa	acaataactc	cgctaggggt	ttcgatgttg	ttgacaacat	360
taagaccgct	gttgagaatg	cctgtcccgg	tgtcgtttct	tgtgctgata	ttttagctct	420
ggcttccgaa	tctgcagttt	ctttggctag	tggtecttca	tggaatgtgt	tgtaggggag	480
aagagacagc	agaacagcaa	accaagcagg	agctaactct	agcattcctg	ctccctttga	540
aagcttaagc	aacattacca	caaagttttc	aaacgttgga	ttgaatgtta	atgatcttgt	600
ggcattatct	ggtgctcata	cctttggacg	cgcacaatgt	cgtacattta	gcaaccgggt	660
attcaacttt	agcaacacgg	gcaatcctga	ttcccacctt	aaacacaacc	tacttagcac	720
tttacaacaa	gtttgtccac	agggcggggc	tggatcaacc	gtgaccaacc	ttgaccgcag	780
aaccccagac	accttcgaca	gcagttatct	ctcaaatttg	cagaacaacc	gtgggcttct	840
gcaatcagat	caggagttgt	tctcaacatc	tggggctgca	accattgcca	ttgtcaacag	900
tttcagtgca	aaccaaactg	ccttcttttc	gagctttgtc	caatccatga	tcaatatggg	960
aaacattagc	cccttaactg	ggaccagtgg	agagattagg	ttaaactgta	ggagacctaa	1020
ttgaggaaaa	ttttgtcact	cctactatta	cctgcctgtc	tctgtatgtt	ttgtcttttc	1080
acagattatt	tatccttttt	gccttttttg	tgtgtcttaa	ggctattttg	ttgtctcgtg	1140
agtgaatctt	gttaggaatt	agttgggtcaa	accaactaat	acaatcagtt	agtaactatc	1200
agttattagc	tgattgccaa	acactttcta	taatagtttg	taattttttt	ctctcatgta	1260
ctagaacata	cactgtacat	gtcagctgtg	gtgtattttt	ttttattttc	agtacctcat	1320
ttttttaatg	aaaaagtgtt	atttatattgt	ttcaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaaa						1390

<210> 5

<211> 1284

<212> DNA

<213> Ipomoea batatas

<400> 5

cttcttcttc	ttcatacttc	tctcttagca	ttacatcatg	gcttcttttcg	caacaaagct	60
cagtcttgcc	ctgagcttgt	tggctctagt	cctagctggc	tactctatct	accagaacac	120
ttactcagcc	attaatggca	ctgagcttca	gcttatccca	acatggctgg	atgaaacatt	180

```

agagtcagcc aacatttctaa gggctctagg tttgggtaaa tcatcgtecg gcatgctttc 240
cgacgaagcc tgcgtgttct ccgctgttaa agaaattgtg gaagctgcca ttactaatga 300
aacacgaatg ggagctttct tcattcgctt cttcttccat gactgcttcg tggacggttg 360
cgatggaggg attctttctaa atgccactaa tggggagcaa agtgcctcgg ccaatgctaa 420
ctcggttagg ggttttgaag tgattgagcg ggccaaacaa aacgcgaaat ctaagtgttc 480
agacacacct gtatcttgtg cagatgtctt agctattgct gctcgtgact cggttgttaa 540
gctgggaggt caaacctaca ctgtgaactt ggggagaaga gatgcaagat ctttcaacct 600
caccggagca aataaccaac ttccggcgcc gttcgatgac ctggcaacac aaacacggaa 660
gttcgccgac aagggtttta accaaacgga gatggtggcg ttggccggag cgcacacggg 720
ggggttcgct aggtgcgcgg ttttgtgcag cagcaataac cttaaccaag ccagaaactc 780
gacgctgcag tgcacctgcc ccgtggcagc gggagacgcg ggtctggtcg ggctggaccc 840
cacaccaagc accatggaca cgcgttattt ccgggacata gtcgacggtc aaggcctcct 900
tttctcggac caagtgtgtg tgaacggcac gaccaccacc gccgcctga ggagataccg 960
ggacggcacc ggcgttttcc tctccgactt cgccgcgcgc atggtcaaga tgggcaacct 1020
ggctccgtcc gccggcgctc agctcgaaat ccgcgacgtt tgcagcatcg tgaatccac 1080
ttccgtggct gccatgtgag aacgtaacgt aacaaaaata atataaatc ctctgagtat 1140
tctgttaa at cctgtgttcg aactctcaac ctctgttaag ggatttgtgt ctgacctct 1200
gtagtagtgt aagattccca atttgtatgt tcaaaataaa aatctagatt gtggcatttc 1260
ttctaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1284

```

<210> 6

<211> 1257

<212> DNA

<213> Ipomoea batatas

<400> 6

```

gttttcagca ctgttaagcc tcagttttca gagagtataa cagcttaagt taggcaacaa 60
tggttaggtc aatcagttgt ttcttcatgg ccattactct tcttgctttt gcaccggttt 120
ccctctgtta caagggtat ggtggtagcc tgtatccaca gtattacgag aagtcgtgcc 180
cgagggcgct agagattgtc aggtctgagg ttgcgaaagc cgtggctaaa gaagcacgaa 240
tggtgcttc tttgatcagg ctctccttcc atgactgttt tgtccagggg tgtgatgcat 300
ctatacttct agacagcggg aatggcataa ccagcgagaa gaattctaac cccaacagaa 360
actctgctcg tgggtttgat gtgattgatg atatcaaagc tgccctggag aaggagtgcc 420
ctcaaactgt ttcttgcgct gatattatgc aacttgctgc cagggtattct acacatctga 480
gtggtggacc attctgggaa gtcccagtag gaaggaaaga ctccagaagt gccagcctga 540
gtggctccaa caacaacatc cctgcaccaa acagcacatt ccaaaccatt cttaacaggt 600
tcaagaacca aggccttgat cttgttgatc ttgtggcatt atctgggagt cacacaattg 660
ggaactcaag atgtgtcagc ttcagacaaa ggcttttcaa ccaagctggg aacaaccaac 720
cagactctac cttggatcag tactatgctg ctgagctgcg caacaggtgc ccgagatccg 780
ggggcgactc gaacctgttt ttcttggtt ttgtgagccc aacaaagttt gacaactcct 840
acttcaagct cttgttggca aacaaggac ttctcaactc agaccaagtt ctgaccacca 900
agaatgaagc atcattgcag ctggtgaaag catatgcaga gaacaatgag cttttccttc 960
aacatttcgc ctcgctccatg attaagatgg ccaacatttc acctctcact ggttccaatg 1020
gagaaatcag gaagaattgc aggaagatca actcttaata caaatactat aaactcaaca 1080
gagaggcatg cagcagaaat aatttaatat tttgtgtctt ggttgtcatg tattgtcctc 1140
ttttttccat tttcccagct tttcagtgct tgtatttctt attttttgat gattttgttt 1200
tgaatggaaa gttttgtttt ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1257

```

<210> 7

<211> 1263

<212> DNA

<213> Ipomoea batatas

<400> 7

```

gttttcagtt ctgttaagcc tcagttttcc agagagtata acagcttaag tttgacaaca 60
atggctgtgt caatcagggtg tttcttcatg gccattactc ttcttgcttt tgcaccgctt 120

```


tcgctctgtc	acaagggcta	tgggtgggtg	ggtggtagta	gtctgtatcc	acagtattac	180
gagaagtcgt	gcccacgagc	actagagatt	gtcaggtttg	aagttgcgaa	agccgtggct	240
aaagaagcaa	gaatggctgc	ttctttgtctc	aggctcgctt	ttcatgactg	ttttgttcag	300
ggatgtgatg	catctatact	tctagacagc	ggtaatggca	taacaagcga	gaagaattct	360
aaccccaaca	gaaaatctgc	tcgcgggttt	aacgtgattg	atgacatcaa	agctgccttg	420
gagaaggagt	gccctcacac	ggttttcttg	gctgatatta	tgcagcttgc	tgccagggat	480
tctacacatc	tgagtgggtg	accattcttg	gaagttccat	taggaaggaa	agactccagg	540
agtgccagcc	tgagtggctc	caacaacaac	atccctgcac	caaacaacac	cttccaaacc	600
atccttacca	agttcaagcg	ccagggcctt	gatcttggtg	atcttggtgg	attatctggg	660
agccacacaa	ttgggaattc	aagatgtacc	agtttcagac	agaggcttta	caaccaatct	720
ggaaacagca	aaccagactc	taccttggtg	cagtactatg	ctgctcagct	gcgcaacagg	780
tgcccgagat	ccgggtggga	tcagaacctg	tttttcttgg	acttcgtgag	ccgaaaaag	840
ttcgacaaca	gctacttcaa	gctcttggtg	gcaacaagg	gacttctcaa	ctcagaccaa	900
gttctgacca	ccaagagtga	agcatcattg	cagctgggtg	aagcatatgc	agagaacaat	960
gagcttttcc	ttcaacattt	cgcctcgtcc	atgatcaaga	tggccaacat	ttgcctctc	1020
actggctcca	agggagaaat	caggaagaat	tgcaggaaga	tcaactctta	atacaaatat	1080
cataaactcc	tactgaaac	agcagaaata	ataaactgtg	tcttggttgt	catgtattgt	1140
cctcttttcc	ccatttttcc	agcttttgag	tgtctgtaat	ctgtatttcc	tcattttttt	1200
gatcggtttg	tgtttgaata	tacannaagt	attacataaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1260
aaa						1263
<210>	8					
<211>	1290					
<212>	DNA					
<213>	Ipomoea batatas					
<400>	8					
caacatcgta	tagtagctta	taaggttgtc	agagaaatta	aggttcaatg	gcggtttctg	60
ttaaggcttt	gactgctgtt	ttgttggtgtg	ttttgggtgct	tgttgggggg	tggtctgctc	120
agcttttcgcc	tgggttttac	tcgaaatcat	gccc aaagct	tttccagaca	gtcaactctg	180
ttgtgcggtc	tgcaatccag	aaagaggctc	gcatgggcgc	ctctctcctt	cgcctcttct	240
tccatgactg	ctttgtcaat	gggtgtgatg	gatcaattct	cttggaacgat	acgtcttctt	300
tcaccggaga	gaaaaggggc	gctcccaact	tccagtccgc	tcgtgggttt	gaggtcattg	360
accaaattaa	gtccgctgtc	gagaaagttt	gtcctggagt	tgtgtcatgc	gctgacattt	420
tggccattgc	ttctcgtgac	tctactgtta	cacttgagg	gcctagttgg	aatgtgaaac	480
ttgggagaag	agatgctagg	actgcaagcc	aagcagcagc	caacaacagc	attcctgctc	540
ccacttctaa	cctcaatcgc	ctcattttcca	gcttcagtgc	tgtcggcctc	tctaccaacg	600
atatggttgt	tttatcaggc	tcacacacaa	ttggacaggc	ccggtgcacg	aacttcaggg	660
caagaatata	caacgagtca	aacatagact	catcctttgc	ccaatccagg	aagggaact	720
gccccagagc	aagtgggtcc	ggggacaaca	acttgcccc	actcgacctc	caaaccceaa	780
taaagtttga	caacaactac	tacgtcaacc	tcgtcaacaa	aaagggtctt	ctccactccg	840
accaacagct	cttcaatggc	gtttcaacag	actcaactgt	gagaggatac	agcacaaacc	900
catcaaaatt	caaatcagat	ttcgcagccg	ccatgatcaa	gatgggtgat	atcaagccac	960
tactgggaa	caatggagag	atcaggaaga	actgcaggag	aagggaactaa	ttaaataatt	1020
aatatataca	taccaaatac	ggatcaatcc	ggcctattat	aattactata	attgtctgta	1080
atggagattt	ctgcagcttt	agtttgattt	tcttggtgta	tgttaagacc	ttttgaggtg	1140
cattatttga	agtgttgaca	gcaaggtcag	aggataattt	ttcttgaatt	taaagtgtta	1200
agtgtgtgat	aattaatgtg	tggaagggtt	tctatatata	aaatccttaa	taaaagtctt	1260
catatttctt	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa				1290
<210>	9					
<211>	356					
<212>	PRT					
<213>	Ipomoea batatas					
<400>	9					

```

Met Ala Ser Phe Val Thr Arg Leu Ser Leu Ala Leu Ser Phe Ile Ala
 1          5          10          15
Leu Ala Leu Ala Gly Phe Ser Ile Tyr Gln Asn Thr His Thr Ala Met
          20          25          30
Lys Gly Gln Leu Lys Leu Thr Pro Lys Trp Leu Leu Asp Asn Thr Leu
          35          40          45
Glu Ser Ser Val Ala Asp Val Leu Ser Leu Arg Leu Gly Ile Ser Ser
          50          55          60
Gly Lys Leu Ser Asp Glu Asp Cys Ile Phe Ser Ala Val Lys Glu Val
 65          70          75          80
Val Asp Ala Ala Ile Asp Ala Glu Thr Arg Met Gly Ala Ser Leu Ile
          85          90          95
Arg Leu Phe Phe His Asp Trp Phe Val Asp Gly Cys Asp Ala Gly Leu
          100          105          110
Leu Leu Asn Asp Thr Pro Thr Phe Thr Arg Glu Gln Thr Ala Gly Gly
          115          120          125
Asn Asn Asn Ser Val Thr Gly Phe Glu Val Ile Gln Gln Ala Lys Glu
          130          135          140
Asn Val Ile Thr Lys Cys Pro Tyr Ile Gln Val Ser Cys Ala Asp Ile
145          150          155          160
Leu Ser Ile Ala Ala Arg Asp Ser Phe Gln Arg Phe Thr Gly Glu Thr
          165          170          175
Tyr Thr Val Thr Leu Gly Arg Leu Asp Ala Arg Thr Ala Asn Leu Thr
          180          185          190
Gly Ala Asn Thr Gln Leu Val Gly Pro Asn Glu Glu Leu Ala Ser Gln
          195          200          205
Val Glu Lys Phe Ala Ala Lys Gly Phe Ser Glu Thr Glu Leu Val Ala
          210          215          220
Leu Leu Gly Val His Thr Val Gly Phe Ser Arg Cys Pro Leu Leu Cys
225          230          235          240
Val Pro Ile Phe Ile Asn Pro Ala Arg Ala Ser Thr Leu Gln Cys Asn
          245          250          255
Cys Pro Val Ser Pro Asp Asp Thr Gly Leu Val Gly Leu Asp Pro Thr
          260          265          270
Pro Leu Thr Trp Asp Gln Ser Phe Tyr Ser Asp Val Ala Asn Gly Gln
          275          280          285
Gly Leu Leu Phe Ser Asp Asn Glu Leu Met Asn Ser Asn Thr Thr Ser
          290          295          300
Ala Ala Val Arg Arg Tyr Arg Asp Glu Met Asp Ala Phe Leu Ala Asp
305          310          315          320
Phe Ala Ala Ala Met Val Lys Met Ser Leu Leu Pro Pro Ser Pro Gly
          325          330          335
Val Glu Leu Glu Ile Arg Glu Val Cys Ser Glu Val Asn Ala Asn Thr
          340          345          350
Val Ala Ser Met
          355
<210> 10
<211> 327
<212> PRT
<213> Ipomoea batatas
<400> 10
Met Ala Ser Phe Ser Ser Leu Leu Ala Met Ala Leu Ala Ile Ser Ile

```

1	5	10	15
Phe Leu Ser His Ser Asn Ala Gln Leu Ser Ser Thr Phe Tyr Ser Thr			
20	25	30	
Thr Cys Pro Asn Val Ser Ser Ile Val Ser Thr Val Ile Gln Gln Ala			
35	40	45	
Leu Gln Asn Asp Ala Arg Ile Gly Ala Ser Leu Ile Arg Leu His Phe			
50	55	60	
His Asp Cys Phe Val Asn Gly Cys Asp Gly Ser Ile Leu Leu Asp Asn			
65	70	75	80
Asn Gly Thr Thr Ile Val Ser Glu Lys Asp Ala Ala Pro Asn Asn Asn			
85	90	95	
Ser Ala Arg Gly Phe Asp Val Val Asp Asn Ile Lys Thr Ala Val Glu			
100	105	110	
Asn Ala Cys Pro Gly Val Val Ser Cys Ala Asp Ile Leu Ala Leu Ala			
115	120	125	
Ser Glu Ser Ala Val Ser Leu Ala Ser Gly Pro Ser Trp Asn Val Leu			
130	135	140	
Leu Gly Arg Arg Asp Ser Arg Thr Ala Asn Gln Ala Gly Ala Asn Thr			
145	150	155	160
Ser Ile Pro Ala Pro Phe Glu Ser Leu Ser Asn Ile Thr Thr Lys Phe			
165	170	175	
Ser Asn Val Gly Leu Asn Val Asn Asp Leu Val Ala Leu Ser Gly Ala			
180	185	190	
His Thr Phe Gly Arg Ala Gln Cys Arg Thr Phe Ser Asn Arg Leu Phe			
195	200	205	
Asn Phe Ser Asn Thr Gly Asn Pro Asp Ser His Leu Lys His Asn Leu			
210	215	220	
Leu Ser Thr Leu Gln Gln Val Cys Pro Gln Gly Gly Ser Gly Ser Thr			
225	230	235	240
Val Thr Asn Leu Asp Pro Thr Thr Pro Asp Thr Phe Asp Ser Ser Tyr			
245	250	255	
Phe Ser Asn Leu Gln Asn Asn Arg Gly Leu Leu Gln Ser Asp Gln Glu			
260	265	270	
Leu Phe Ser Thr Ser Gly Ala Ala Thr Ile Ala Ile Val Asn Ser Phe			
275	280	285	
Ser Ala Asn Gln Thr Ala Phe Phe Gln Ser Phe Val Gln Ser Met Ile			
290	295	300	
Asn Met Gly Asn Ile Ser Pro Leu Thr Gly Thr Ser Gly Glu Ile Arg			
305	310	315	320
Leu Asn Cys Arg Arg Pro Asn			
325			
<210>	11		
<211>	353		
<212>	PRT		
<213>	Ipomoea batatas		
<400>	11		
Met Ala Ser Phe Ala Thr Lys Leu Ser Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala			
1	5	10	15
Leu Val Leu Ala Gly Tyr Ser Ile Tyr Gln Asn Thr Tyr Ser Ala Ile			
20	25	30	
Asn Gly Thr Glu Leu Gln Leu Ile Pro Thr Trp Leu Asp Glu Thr Leu			
35	40	45	

Glu Ser Ala Asn Ile Leu Arg Ala Leu Gly Leu Gly Lys Ser Ser Ser
50 55 60
Gly Met Leu Ser Asp Glu Ala Cys Val Phe Ser Ala Val Lys Glu Ile
65 70 75 80
Val Glu Ala Ala Ile Thr Asn Glu Thr Arg Met Gly Ala Ser Leu Ile
85 90 95
Arg Leu Phe Phe His Asp Cys Phe Val Asp Gly Cys Asp Gly Gly Ile
100 105 110
Leu Leu Asn Ala Thr Asn Gly Glu Gln Ser Ala Pro Ala Asn Ala Asn
115 120 125
Ser Val Arg Gly Phe Glu Val Ile Glu Arg Ala Lys Gln Asn Ala Lys
130 135 140
Ser Lys Cys Ser Asp Thr Pro Val Ser Cys Ala Asp Val Leu Ala Ile
145 150 155 160
Ala Ala Arg Asp Ser Val Val Lys Leu Gly Gly Gln Thr Tyr Thr Val
165 170 175
Asn Leu Gly Arg Arg Asp Ala Arg Ser Phe Asn Leu Thr Gly Ala Asn
180 185 190
Asn Gln Leu Pro Ala Pro Phe Asp Asp Leu Ala Thr Gln Thr Arg Lys
195 200 205
Phe Ala Asp Lys Gly Phe Asn Gln Thr Glu Met Val Ala Leu Ala Gly
210 215 220
Ala His Thr Val Gly Phe Ala Arg Cys Ala Val Leu Cys Ser Ser Asn
225 230 235 240
Asn Leu Asn Gln Ala Arg Asn Ser Thr Leu Gln Cys Thr Cys Pro Val
245 250 255
Ala Ala Gly Asp Ala Gly Leu Val Gly Leu Asp Pro Thr Pro Ser Thr
260 265 270
Met Asp Thr Arg Tyr Phe Arg Asp Ile Val Asp Gly Gln Gly Leu Leu
275 280 285
Phe Ser Asp Gln Val Leu Leu Asn Gly Thr Thr Thr Thr Ala Ala Val
290 295 300
Arg Arg Tyr Arg Asp Gly Thr Gly Ala Phe Leu Ser Asp Phe Ala Ala
305 310 315 320
Ala Met Val Lys Met Gly Asn Leu Ala Pro Ser Ala Gly Val Gln Leu
325 330 335
Glu Ile Arg Asp Val Cys Ser Ile Val Asn Pro Thr Ser Val Ala Ala
340 345 350

Met

<210> 12

<211> 332

<212> PRT

<213> Ipomoea batatas

<400> 12

Met Ala Arg Ser Ile Ser Cys Phe Phe Met Ala Ile Thr Leu Leu Ala
1 5 10 15
Phe Ala Pro Val Ser Leu Cys Tyr Lys Gly Tyr Gly Gly Ser Leu Tyr
20 25 30
Pro Gln Tyr Tyr Glu Lys Ser Cys Pro Arg Ala Leu Glu Ile Val Arg
35 40 45
Ser Glu Val Ala Lys Ala Val Ala Lys Glu Ala Arg Met Ala Ala Ser
50 55 60

```

Leu Ile Arg Leu Ser Phe His Asp Cys Phe Val Gln Gly Cys Asp Ala
65          70          75          80
Ser Ile Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gly Ile Thr Ser Glu Lys Asn Ser
85          90          95
Asn Pro Asn Arg Asn Ser Ala Arg Gly Phe Asp Val Ile Asp Asp Ile
100         105         110
Lys Ala Ala Leu Glu Lys Glu Cys Pro Gln Thr Val Ser Cys Ala Asp
115         120         125
Ile Met Gln Leu Ala Ala Arg Asp Ser Thr His Leu Ser Gly Gly Pro
130         135         140
Phe Trp Glu Val Pro Val Gly Arg Lys Asp Ser Arg Ser Ala Ser Leu
145         150         155         160
Ser Gly Ser Asn Asn Asn Ile Pro Ala Pro Asn Ser Thr Phe Gln Thr
165         170         175
Ile Leu Asn Arg Phe Lys Asn Gln Gly Leu Asp Leu Val Asp Leu Val
180         185         190
Ala Leu Ser Gly Ser His Thr Ile Gly Asn Ser Arg Cys Val Ser Phe
195         200         205
Arg Gln Arg Leu Tyr Asn Gln Ala Gly Asn Asn Gln Pro Asp Ser Thr
210         215         220
Leu Asp Gln Tyr Tyr Ala Ala Gln Leu Arg Asn Arg Cys Pro Arg Ser
225         230         235         240
Gly Gly Asp Ser Asn Leu Phe Phe Leu Asp Phe Val Ser Pro Thr Lys
245         250         255
Phe Asp Asn Ser Tyr Phe Lys Leu Leu Leu Ala Asn Lys Gly Leu Leu
260         265         270
Asn Ser Asp Gln Val Leu Thr Thr Lys Asn Glu Ala Ser Leu Gln Leu
275         280         285
Val Lys Ala Tyr Ala Glu Asn Asn Glu Leu Phe Leu Gln His Phe Ala
290         295         300
Ser Ser Met Ile Lys Met Ala Asn Ile Ser Pro Leu Thr Gly Ser Asn
305         310         315         320
Gly Glu Ile Arg Lys Asn Cys Arg Lys Ile Asn Ser
325         330

```

```

<210>    13
<211>    336
<212>    PRT
<213>    Ipomoea batatas
<400>    13

```

```

Met Ser Val Ser Ile Arg Cys Phe Phe Met Ala Ile Thr Leu Leu Ala
1          5          10          15
Phe Ala Pro Leu Ser Leu Cys His Lys Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Gly
20         25         30
Ser Ser Leu Tyr Pro Gln Tyr Tyr Glu Lys Ser Cys Pro Arg Ala Leu
35         40         45
Glu Ile Val Arg Phe Glu Val Ala Lys Ala Val Ala Lys Glu Ala Arg
50         55         60
Met Ala Ala Ser Leu Leu Arg Leu Ala Phe His Asp Cys Phe Val Gln
65         70         75         80
Gly Cys Asp Ala Ser Ile Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gly Ile Thr Ser
85         90         95
Glu Lys Asn Ser Asn Pro Asn Arg Lys Ser Ala Arg Gly Phe Asn Val

```

[illegible]

Lys Leu Gly Arg Arg Asp Ala Arg Thr Ala Ser Gln Ala Ala Ala Asn
 145 150 155 160
 Asn Ser Ile Pro Ala Pro Thr Ser Asn Leu Asn Arg Leu Ile Ser Ser
 165 170 175
 Phe Ser Ala Val Gly Leu Ser Thr Asn Asp Met Val Val Leu Ser Gly
 180 185 190
 Ser His Thr Ile Gly Gln Ala Arg Cys Thr Asn Phe Arg Ala Arg Ile
 195 200 205
 Tyr Asn Glu Ser Asn Ile Asp Ser Ser Phe Ala Gln Ser Arg Lys Gly
 210 215 220
 Asn Cys Pro Arg Ala Ser Gly Ser Gly Asp Asn Asn Leu Ala Pro Leu
 225 230 235 240
 Asp Leu Gln Thr Pro Ile Lys Phe Asp Asn Asn Tyr Tyr Val Asn Leu
 245 250 255
 Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu His Ser Asp Gln Gln Leu Phe Asn Gly
 260 265 270
 Val Ser Thr Asp Ser Thr Val Arg Gly Tyr Ser Thr Asn Pro Ser Lys
 275 280 285
 Phe Lys Ser Asp Phe Ala Ala Met Ile Lys Met Gly Asp Ile Lys
 290 295 300
 Pro Leu Thr Gly Asn Asn Gly Glu Ile Arg Lys Asn Cys Arg Arg Arg
 305 310 315 320

Asn
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer for swpa4 gene
 <400> 15
 cagcgaggtg aatgccaaca 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer for swpa4 gene
 <400> 16
 ttcagtaata caagttttgt 20
 <210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer for swpa5 gene
 <400> 17
 tccgtgagtg aaatctgtt 19
 <210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> reverse primer for swpa5 gene
 <400> 18
 aaaaaatgag gtactgaaaa taaa 24
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer for swpa6 gene
 <400> 19
 cgtaacgtaa caaaaataat a 21
 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer for swpa6 gene
 <400> 20
 atctagattt ttattttgaa cat 23
 <210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer for swpb1 gene
 <400> 21
 gatcaactct taatacaa at aca 23
 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer for swpb1 gene
 <400> 22
 aaaacaaaat catcaaaaa 19
 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer for swpb2 gene
 <400> 23
 gatcaactct taatacaa at a 21
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer for swpb2 gene
 <400> 24
 aaaaatgtgg aaatacagat 20
 <210> 25

<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	forward primer for swpb3 gene	
<400>	25	
	gaagaactgc aggagaagga actaat	26
<210>	26	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer for swpb3 gene	
<400>	26	
	gaaaaattat cctctgacc	19